

## **BAB 1**

### **PENDAHULUAN**

#### **1.1 Latar Belakang Masalah**

Karies adalah penyakit yang dapat dicegah, bersifat kronis dan dimediasi oleh bioilm yang dimodulasi oleh makanan. Penyebab utamanya yaitu karena ketidakseimbangan flora oral (biofilm) karena adanya karbohidrat makanan yang dapat difermentasi oleh bakteri pada permukaan gigi dari waktu ke waktu (Ritter, 2019). Karies yang berkelanjutan dapat menyebabkan terbukanya ruang pulpa, kemudian mengakibatkan peradangan pulpa, dan akhirnya terjadi nekrosis (Ingle, 2019). Menurut WHO, 2,3 miliar orang memiliki karies pada gigi permanennya dan 560 juta anak memiliki karies pada gigi sulung (WHO, 2017). Berdasarkan data Riskesdas tahun 2018, terjadi peningkatan penduduk Indonesia yang mengalami masalah gigi dan mulut pada tahun 2007 sebanyak 43,4%, tahun 2013 sebanyak 53,2% dan tahun 2018 sebanyak 57,6%. Hasil Riset Kesehatan Dasar atau Riskesdas 2018 menyebutkan bahwa 93% anak usia dini yaitu anak dengan rentang usia 5-6 tahun mengalami gigi berlubang.

Karies gigi dimulai dari pembentukan biofilm plak gigi ketika lingkungan mendukung pertumbuhan dan metabolisme bakteri asidogenik. Bakteri anaerob yang ada pada karies dapat menyebabkan infeksi endodontik yang terjadi pada saat pulpitis. Data menunjukkan bahwa adanya bakteri dalam jumlah tinggi pada lesi karies dapat menjadi indikasi patosis pulpitis ireversibel (Ingle, 2019). Sinyal inflamasi yang masuk ke dalam pulpa melalui tubuli dentin dapat berkembang menjadi degenerasi dan nekrosis (Park et al, 2015). Inflamasi jaringan pulpa atau

pulpitis dan nekrosis pulpa harus dilakukan perawatan berupa perawatan saluran akar (Hargreaves, 2016).

Di antara sesi perawatan saluran akar, terdapat kemungkinan terjadinya *flare up*. *Flare up* adalah terjadinya rasa nyeri, bengkak atau keduanya selama perawatan saluran akar yang menyebabkan pasien melakukan kunjungan yang tidak terjadwal ke dokter gigi. Inflamasi periapikal akut adalah penyebab paling umum dari nyeri dan pembengkakan pada pertengahan perawatan. *Interappointment* emergensi adalah kejadian yang tidak diinginkan dan mengganggu sehingga tahapan perawatan saluran akar tidak dapat diselesaikan (Garg, 2014).

Menurut penelitian prospektif yang dilakukan di Israel selama 8 bulan menunjukkan bahwa 63,8% dari 274 pasien mengalami *post endodontic pain* (PEP) (Gotler, 2012). *Comparative study* yang dilakukan di Liaquat Medical University Hospital Hyderabad dari 1 Mei sampai 30 November 2010 menunjukkan 58% dari 60 pasien mengalami rasa nyeri sehari setelah perawatan saluran akar dengan intensitas ringan sampai parah (Memon, 2013). Pada penelitian yang dilakukan di Makasar, menunjukkan angka flare up mencapai 5,5% yaitu 39 dari 708 pasien (Mohpul, 2013). Penelitian *cross sectional* yang dilakukan departemen gigi Universitas Rumah Sakit Aga Khan Karachi Pakistan dari bulan Januari sampai Desember 2009 menunjukkan bahwa 42,9% dari 140 pasien mengalami *post operative pain* setelah obturasi dalam kurun waktu 24 jam (Durre and Muhammad, 2014). Berdasarkan penelitian Alshehri dkk, Insiden terjadinya flare-up adalah 16 (3,5%) dari 454 gigi yang menjalani perawatan

(Alshehri *et al*, 2018). Data-data tersebut menunjukkan bahwa masih ada rasa nyeri selama atau setelah perawatan saluran akar yang seharusnya tidak terjadi.

Terdapat beberapa faktor resiko yang dapat menyebabkan terjadinya flare up termasuk usia, jenis kelamin, jenis gigi, jumlah saluran akar, diagnosis pulpa awal, jenis bahan irigasi, dan jumlah kunjungan (Onay, 2015). Usia, jenis kelamin, dan diagnosis pasien memiliki efek yang signifikan pada terjadinya flare-up, namun jenis gigi, posisi gigi, jumlah saluran akar, jumlah kunjungan, dan modalitas perawatan tidak berpengaruh signifikan terhadap kejadian flare-up (Mathew *et al*, 2017). Hubungan antara frekuensi terjadinya *flare up* setelah perawatan endodontik, intensitas nyeri dan kondisi pulpa (vital atau nekrosis) masihlah kontroversial (Sipaviciute and Maneliene, 2014).

Kualitas pulpa dalam hal ini keadaan pulpa itu sendiri sangat berhubungan dengan diagnosa jaringan pulpa yang dapat mempengaruhi terjadinya *flare up* (Sampoerno, 2019). Jaringan gigi merupakan jaringan yang unik karena memiliki jaringan lunak (kompleks pulp dan dentin) yang tertutup dalam jaringan keras mineral (enamel, dentin dan semen), dan pulpa dipasok oleh jaringan neurovaskular yang mengatur berbagai mediator inflamasi (Park *et al*, 2015). Pulpa gigi adalah jaringan ikat yang terdiri dari saraf, pembuluh darah, cairan interstisial, odontoblas, fibroblas, dan komponen seluler lainnya (Ingle, 2019). Pada pulpa normal, saraf didominasi oleh serabut saraf A delta dan serabut saraf C. Gigi premolar manusia menerima sekitar 2300 akson pada apeks akar, dimana 13% adalah myelinated dan 87% serat non-myelinated. Akson myelinated di apeks adalah serabut A-delta pengikat cepat yang terletak di pinggiran pulpa

dan dentin. Sedangkan serat non myelinated adalah serabut saraf C yang ada didalam pulpa (Goldberg, 2019).

Dalam kondisi normal, serabut saraf yang mengirimkan impuls nyeri gigi tidak distimulasi oleh stimulan biasa seperti iritasi dingin dan panas. Tetapi dalam kondisi patologis seperti trauma dan karies, serabut saraf mudah distimulasi dan menghasilkan impuls nyeri. Sebuah studi elektrofisiologis menunjukkan bahwa kecepatan potensial aksi saraf berkurang di lingkungan peradangan. Dalam studi lain yang mengevaluasi morfologi serabut saraf dalam lingkungan inflamasi, terdapat neurodegenerative dan penghancuran selubung mielin. Selain itu juga ada protein baru yang ditemukan dalam eksoplasma serabut saraf dalam kondisi inflamasi yang tidak ada pada serabut saraf yang sehat (Modaresi, 2020). Sehingga dapat dikatakan kualitas jaringan pulpa dipengaruhi oleh sel saraf yang ada di jaringan pulpa tersebut.

Penyebab inflamasi paling signifikan adalah mikroba, karena iritasi mekanis dan kimiawi sebagian besar bersifat sementara. Penelitian telah menunjukkan bahwa bahkan lesi karies superfisial di email mampu menarik sel inflamasi di pulpa. Lesi karies adalah penyebab paling umum terjadinya reaksi inflamasi pulpa dan dampak trauma juga dapat membuat pulpa terpapar ke rongga mulut sehingga memungkinkan mikroorganisme untuk masuk ke dalam ruang pulpa (Galler *et al*, 2021). Karies disebabkan karena bakteri dan produk asamnya yang menyebabkan demineralisasi enamel. Salah satu bakteri penyebab karies adalah *Lactobacillus plantarum* yang terdapat pada karies yang dalam dan mengenai dentin. Bakteri tersebut memiliki Lipoteichoic Acid (LTA) yang berperan dalam factor virulensi (Jang *et al*, 2011). Sedangkan penyebab utama

inflamasi pulpa adalah kombinasi antara bakteri anaerob seperti *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* dan *Treponema denticola* yang memiliki Lipopolisakarida (LPS). LPS akan menstimulasi sel pulpa gigi sehingga terjadi perubahan morfologi dan struktur yang mengarah ke apoptosis (Yang *et al*, 2010).

Inflamasi dapat mengaktivasi beberapa faktor dan jalur pensinyalan yang terlibat dalam regulasi apoptosis sel. Sel apoptosis dapat mengekspos sinyal "*eat me*", yang kemudian akan difagositosis oleh sel apoptosis. Proses fagositosis sel apoptosis merupakan mekanisme anti inflamasi. Apoptosis juga merupakan proses kematian sel untuk mengurangi jumlah sel yang berlebih atau yang tidak diinginkan. Sel apoptosis jarang terdeteksi dalam kondisi fisiologis, tetapi keberadaan sel apoptosis dikaitkan dengan beberapa kondisi, termasuk infeksi dan inflamasi (Yang, 2015).

Infeksi odontogenik umumnya disebabkan oleh polimikroba dan didominasi oleh bakteri anaerob. Respons pulpa berupa peradangan dan akhirnya dapat terjadi nekrosis pulpa. Peradangan dapat menyebar ke tulang alveolar di sekitarnya dan menyebabkan patosis periapikal. Dalam proses ini, lipopolisakarida (LPS) dari bakteri memainkan peran potensial dalam beberapa respons terhadap infeksi pulpa. Bakteri *Porphyromonas gingivalis* dapat menginduksi inflamasi pulpa dan memiliki LPS sebagai stimulator inflamasi (Jin-Ko *et al*, 2015). LPS adalah bagian dari dinding sel bakteri gram negatif yang berperan penting untuk integritas, kelangsungan hidup, dan pertahanan sel bakteri dari lingkungan. LPS terdapat pada hampir semua bakteri Gram-negatif dan merupakan penginduksi respons inflamasi yang kuat. Dengan demikian, LPS

dapat secara langsung memodulasi sistem kekebalan tubuh dari penyakit. LPS adalah *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP) kuat yang dikenali oleh *toll-like receptor-4* (TLR4) pada permukaan sel fagosit seperti makrofag, neutrofil, dan sel dendritik. Pengikatan LPS oleh TLR4 menginduksi kaskade pensinyalan yang pada akhirnya menginduksi peradangan dan produksi sitokin proinflamasi yang membantu menghilangkan patogen yang menyerang (Mazgaeen dan Gurung, 2020). Sepsis yang diinduksi LPS menyebabkan peningkatan caspase-9 dan caspase-3 yang kemudian menyebabkan terjadinya apoptosis (Haryanto *et al*, 2019).

LPS adalah bahan aktif endotoksin dari bakteri gram negative yang memiliki banyak aktivitas biologis termasuk sebagai faktor pemicu peradangan dalam respon imun. Pada saat terjadinya pulpitis, LPS menyebabkan pelepasan faktor inflamasi, dan membawa toksisitas pada sel pulpa gigi secara langsung atau tidak langsung. Kandungan LPS yang tinggi dapat menyebabkan reaksi kaskade inflamasi, dimana bakteri direplikasi di dalam plasma, memfasilitasi akumulasi LPS dalam sirkulasi darah, sehingga merusak struktur sel mitokondria dan lisosom sehingga menyebabkan pulpitis (Feng, 2017). Selain itu, sel pulpa gigi menunjukkan peningkatan ekspresi Bcl-2 dan Bax setelah terpapar konsentrasi LPS tinggi. Peningkatan ekspresi Bcl-2 dan Bax menunjukkan bahwa terdapat peningkatan apoptosis sel pulpa gigi yang diinduksi LPS. Apoptosis sel secara statistik lebih tinggi pada 3 hari setelah terpapar LPS dibandingkan dengan 1 hari setelah terpapar LPS (Yang, 2010). Pada studi lain juga mengatakan peningkatan sitokin dan TNF- $\alpha$  pada 2 jam setelah paparan LPS hingga 48 jam setelahnya, namun akan menurun pada 72 jam setelah paparan LPS (Meneses *et al*, 2020).

Sistem imun merupakan mekanisme efektor yang mampu menghancurkan organisme patogen seperti bakteri, jamur, virus, dan parasit. Sistem imun terdiri dari dua jenis respons: respons imun adaptif dan respons imun bawaan atau alami. Sistem imun bawaan merupakan pertahanan pertama dalam melawan invasi patogen pada manusia (Carrillo et al, 2017). Titik interaksi awal terjadi antara bakteri yang berpotensi patogen dan TLR yang ada pada membran sel. TLR dapat mengenali berbagai macam struktur komponen mikroba yang disebut *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs). TLR 4 merupakan reseptor spesifik yang berinteraksi dengan ligan LPS, yang berasal dari bakteri Gram negative. Teraktivasinya makrofag dari hasil interaksi antara komponen dinding sel bakteri, LPS dengan TLR4 merupakan jalur utama untuk memulai suatu respon imun innate dan terjadinya inflamasi. TLR4 merekrut MYD88 dan kompleks IRAK termasuk TRAF6 yang mengaktifkan TAK1. Setelah aktivasi TAK1 dan IKK, faktor transkripsi NF- $\kappa$ B bersama dengan MAPK mengaktifkan AP-1 untuk mengatur ekspresi sitokin pro-inflamasi dan gen terkait seperti IL-6, TNF-, IL -1 (LA Fata et al, 2018). *Tumor Necrosis Factor* (TNF) merupakan sitokin yang dihasilkan oleh monosit dan makrofag, teraktivasi sebagai respon adanya infeksi patogen. TNF dapat menimbulkan berbagai jenis efek tergantung pada stimulus dan jenis sel dengan mengaktifkan reseptornya *Tumor Necrosis Factor Receptor* (TNFR) (Astawa, 2018).

Apoptosis merupakan proses yang penting karena dapat menggambarkan patogenesis suatu penyakit. Terdapat dua jalur apoptosis utama yaitu caspase dependen dan caspase independen. Sinyal apoptosis jalur caspase dependen bisa terjadi secara intraseluler dan ekstraseluler. Jalur ekstrinsik (ekstraseluler)

diinisiasi stimulasi reseptor kematian sedangkan jalur intrinsik diinisiasi oleh pelepasan faktor sinyal dari mitokondria dalam sel (Sari, 2018). Pada jalur reseptor kematian, protein yang bertindak sebagai reseptor adalah kelompok TNF-R. Sedangkan pada jalur intrinsik akan diinduksi oleh mitokondria dengan melepaskan Cytochrome C dari intermembran mitokondria. Cytochrome C adalah suatu heme protein yang bertindak sebagai suatu pembawa elektron dalam fosforilasi oksidasi mitokondria, pemberhenti elektron Cytochrome C oksidase, keluar intermembran dan mengikat protein sitoplasmik yang disebut *Apaf-1* dan nantinya akan mengaktifkan caspase 9 dan caspase 3 (Sari, 2018).

Salah satu ciri utama perubahan biokimia pada apoptosis adalah aktivasi caspase. Aktivasi caspase menyebabkan keluarnya protein vital selular dan memecah perancah nuklear serta kerangka dinding sel (Sari, 2018). Caspase apoptosis secara fungsional dibagi menjadi caspase inisiator yaitu caspase 8, 9 dan 10, serta caspase efektor yaitu caspase 3, 6 dan 7 (Opdenbosch dan Lamkanfi, 2019). Mekanisme utama yang juga mendasari terjadinya apoptosis ialah aktivitas *cysteine aspartic acid protease* (caspase). Salah satu caspase yang berperan dalam menginduksi apoptosis ialah caspase 3. Caspase ini dapat diaktifkan melalui mekanisme intrinsik (jalur mitokondrial) maupun ekstrinsik (*death ligand*), dengan bantuan caspase 8 dan caspase 9. Bila caspase 3 teraktifkan maka sebagai caspase eksekutor, akan melakukan tugasnya untuk mengapoptosis sel (Moningka, 2019).

TNF- $\alpha$  berperan penting dalam apoptosis jalur ekstrinsik. Apoptosis ekstrinsik dimulai oleh pengikatan ligan spesifik seperti tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), ligan Fas (FasL), dan ligan penginduksi apoptosis terkait faktor nekrosis

tumor (TRAIL) ke reseptornya yang sesuai yang disebut 'reseptor kematian'. TNF- $\alpha$  yang berikatan dengan TNFR akan menghasilkan protein adaptor TRADD (TNFR-Associated Dead Domain) dengan perekrutan Fas Associated with Dead Domain (FADD). Perekrutan ini akan mengaktifkan caspase 8 dan kemudian mengaktifkan caspase 3 sehingga terjadi apoptosis (Astawa, 2018).

Immunohistokimia (IHC) adalah teknik untuk mengidentifikasi sel atau jaringan (antigen) melalui interaksi antigen-antibodi. Teknik ini berguna sebagai prosedur diagnostik tambahan dalam histopatologi, sehingga memberi dampak yang luar biasa pada perawatan dan manajemen pasien. Immunohistokimia merupakan gabungan antara histology dan imunologi (Pavithra et al, 2016). Immunohistokimia adalah suatu metode pewarnaan substansi aktif di dalam jaringan dengan menggunakan prinsip dasar imunologi yaitu pengikatan bahan aktif (antigen) pada sisi aktif yang spesifik oleh bahan aktif (antibodi). Hasil reaksi antigen antibody tersebut dapat diidentifikasi pada specimen apabila antibody diikat oleh suatu penanda (marker) yang dapat divisualisasikan, sehingga dapat mengetahui keberadaan bahan aktif tersebut di dalam jaringan (Bintari, 2016). Aplikasi immunohistokimia baru-baru ini telah diperluas secara eksplosif karena semakin banyak molekul yang terlibat dalam patogenesis, diagnosis, dan pengobatan penyakit yang ditemukan.

Berdasarkan fakta-fakta tersebut di atas timbul suatu pemikiran bahwa perlu dilakukan penelitian tentang jalur apoptosis yang paling berperan yang menyebabkan penurunan jumlah sel saraf akibat inflamasi karena pemberian LPS.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian di atas, maka timbul permasalahan sebagai berikut:

1. Apakah ada peningkatan TNF- $\alpha$  pada pada sel saraf jaringan pulpa setelah pemberian LPS?
2. Apakah ada peningkatan *Cytochrome C* pada pada sel saraf jaringan pulpa setelah pemberian LPS?
3. Apakah ada penurunan jumlah sel saraf jaringan pulpa setelah pemberian LPS?
4. Apakah ada hubungan antara TNF- $\alpha$ , *Cytochrome C* dan jumlah sel saraf jaringan pulpa setelah pemberian LPS?

## 1.3 Tujuan Penelitian

### 1.3.1 Tujuan Umum

Untuk mengetahui proses apoptosis jalur ekstrinsik atau intrinsik setelah pemberian LPS pada sel saraf jaringan pulpa.

### 1.3.2 Tujuan Khusus

1. Menganalisa peningkatan TNF- $\alpha$  pada pada sel saraf jaringan pulpa setelah pemberian LPS
2. Menganalisa peningkatan *Cytochrome C* pada pada sel saraf jaringan pulpa setelah pemberian LPS
3. Menganalisa penurunan jumlah sel saraf jaringan pulpa setelah pemberian LPS
4. Menganalisa hubungan antara TNF- $\alpha$ , *Cytochrome C* dan jumlah sel saraf jaringan pulpa setelah pemberian LPS

## **1.4 Manfaat Penelitian**

### **1.4.1 Manfaat Teoritis**

Hasil penelitian ini dapat membuktikan bahwa LPS dapat menyebabkan apoptosis sel saraf jaringan pulpa gigi melalui jalur intrinsik yang diperankan oleh *Cytochrome C* dan ekstrinsik yang diperankan oleh  $\text{TNF-}\alpha$ , dimana jalur ekstrinsik lebih dominan dibandingkan dengan jalur intrinsik.

### **1.4.2 Manfaat Praktis**

Sebagai dasar pengembangan strategi pencegahan dan manajemen potensi terjadinya *flare up* pada jaringan pulpa gigi yang mengalami inflamasi.